

REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

Marcello Fabiano de FRANCO (1), Celeste FAVA NETTO (2) e Luis Gastão CHAMMA (3)

R E S U M O

Descreve-se reação de imunofluorescência indireta quantitativa (RII) para o sorodiagnóstico da blastomicose sul-americana (BSA). Usou-se como antígeno, as paredes celulares da forma cerebriforme do *Paracoccidioides brasiliensis*, que permaneceu no sedimento, após o preparo do antígeno polissacarídico solúvel empregado na reação de fixação do complemento de FAVA NETTO (RFC). A RII foi realizada em 50 soros de pacientes com BSA, positivos na RFC, e em 50 soros de pacientes não-portadores de micoses profundas, negativos na RFC (grupo controle). A RII foi negativa nos soros do grupo controle e positiva nos soros de pacientes com BSA; houve correlação significativa entre os títulos das duas reações ($p < 0,001$). A RII realizada em eluatos, a partir de gotas de sangue coletadas em papel de filtro (nove pacientes com BSA) forneceu resultados comparáveis aos obtidos com os soros dos mesmos pacientes. A simplicidade da reação proposta, sua sensibilidade e a possibilidade de sua aplicação em eluatos a partir de gotas de sangue coletadas em papel de filtro, tornam a RII um método sorológico útil, especialmente em inquéritos populacionais.

I N T R O D U Ç Ã O

A técnica direta de imunofluorescência, através do uso de anticorpos fluoresceinados específicos, tem sido empregada com frequência no estudo de micoses humanas, quer para a demonstração dos fungos em material clínico quer em tecidos^{6, 7, 8, 10, 11, 12}. Mais raramente, a literatura registra a padronização de reações de imunofluorescência indireta (RII) para o diagnóstico sorológico destas micoses, como recentemente revisto por RESTREPO MORENO⁹.

No presente trabalho, propomos uma RII para o diagnóstico sorológico da blastomicose sul-americana (BSA). Para que o método

padronizado tivesse especificidade comparável à da reação de fixação do complemento (RFC), o antígeno por nós utilizado foi preparado de modo semelhante ao do antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*)³. A RII foi ensaiada em 50 soros de pacientes portadores de BSA, com RFC positiva, e em 50 soros de pacientes não-portadores de micoses profundas, com RFC negativa.

A RII foi também realizada em 9 casos de BSA, a partir de gotas de sangue coletadas em papel de filtro.

- (1) Professor Assistente Doutor do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu (FCMBB), São Paulo, Brasil
- (2) Professor Titular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
- (3) Técnico do Departamento de Patologia da FCMBB

MATERIAL E MÉTODOS

1. Preparação do antígeno

Empregamos como antígeno a forma cerebriforme da amostra 265 do *P. brasiliensis*, proveniente da micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A amostra foi cultivada no meio de FAVA NETTO³, a 37°C, em tubos de 20 x 220 mm, durante 1 semana.

A seguir, a cultura foi suspensa em solução salina estéril, mantida em refrigerador a 4°C (pré-gelada), e os fungos separados por centrifugação a 4°C, a 1500 rpm, por 10-15 min. A seguir, os fungos foram desengorurados por três vezes em acetona pré-gelada e por três vezes em éter anidro pré-gelado. Após a última passagem em éter anidro, os fungos foram secados a 4°C por 18 h, suspensos em solução salina tamponada (SST) (NaCl 0,15 M; fosfatos 0,01 M; pH 7,2), no volume de 5 ml por tubo de cultura, e autoclavados a 120°C por 15 minutos. Em seguida, os fungos foram por duas vezes lavados em SST pré-gelada e suspensos em SST para opacidade equivalente à do tubo 4 da escala turbidimétrica de MacFarland. O antígeno assim preparado foi depositado em lâminas, segundo a técnica descrita por CAMARCO¹. Corando-se essas lâminas pela técnica de Hematoxilina e Eosina, verifica-se que os fungos mantêm sua morfologia, sendo frequentes as formas em gemulação. Foram consideradas satisfatórias as preparações em que havia 10 a 15 fungos por campo microscópico de 600 X.

As lâminas contendo o antígeno foram embrulhadas em papel de alumínio e mantidas a -20°C.

2. Soros

2.1. *Soros ensaiados*: A RII foi testada em 50 soros de pacientes portadores de BSA positivos na RFC e em 50 soros de pacientes não-portadores de micoses profundas com RFC negativa (soros controles). A RFC

foi realizada segundo a técnica descrita por FAVA NETTO³.

Todos os soros foram mantidos a -20°C; antes das reações, foram inativados por 30 minutos, a 56°C. A seguir, os soros foram diluídos a 1/4 em SST e inicialmente testados qualitativamente; os soros positivos foram também testados quantitativamente, com diluições sucessivas de razão 2 até 1/512.

2.2. *Soros padrões*: As reações foram sempre realizadas com 2 soros padrões, positivo e negativo, para BSA. *Soro padrão positivo*: Obtido de paciente portador dessa micose profunda, apresentando título de 1/128 na RII, de 220 na RFC e com resultado positivo (++++) à pesquisa de precipitinas (FAVA NETTO⁴). *Soro padrão negativo*: Obtido de indivíduo normal, não reativo na RII, na RFC e na reação para precipitinas.

3. Eluatos

De 9 pacientes com BSA foram colhidas gotas de sangue em papel de filtro (Klabin 80 g), através de picada com agulha da ponta do dedo indicador da mão esquerda. Os papéis, após secagem, foram mantidos por 1 a 2 meses a -20°C.

No momento da reação, de cada mancha de sangue, com um furador, foram cortados discos com 1,3 cm de diâmetro. Dos discos, segundo a técnica descrita por SOUZA & CAMARCO¹³, foram obtidos eluatos, em tubos contendo 0,2 ml de SST. Estes eluatos foram processados na RII da mesma forma do que os soros.

Os soros destes mesmos casos, obtidos quando da coleta do sangue em papel de filtro, foram diluídos a 1/10 em SST e processados da mesma forma.

4. Conjugado anti-globulina humana

Usamos um conjugado de globulina de cabra anti-Ig total humana (IgG, IgM e IgA) com isotocianato de fluoresceína, adquirido do Laboratório Hyland (*).

(*) Hyland — Div. Travenol Labor. Inc. — USA — Partida n.º 202.R007A1

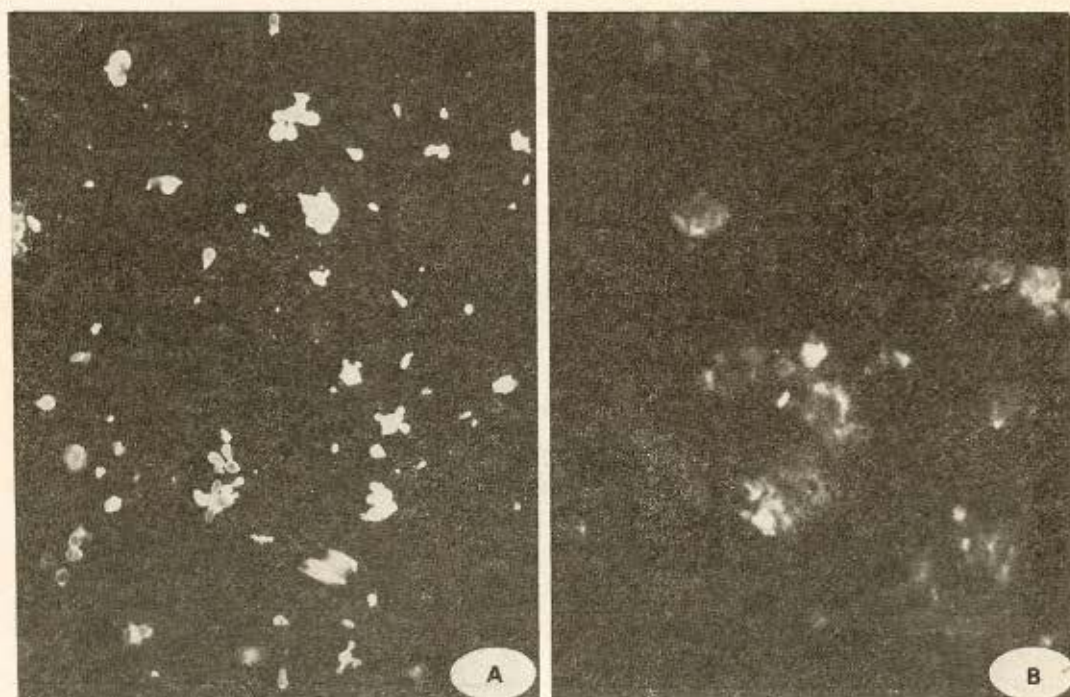


Fig. 1 — A — Reação positiva, mostrando fungos com intensa fluorescência da parede celular; freqüentes formas em gemulação (190 ×). B — Reação negativa, mostrando fungos com ausência de fluorescência da parede celular. Grumos irregulares de fluorescência inespecífica em meio a fungos aglomerados (500 ×).

O conjugado foi usado na diluição de 1/60 em SST, contendo azul de Evans a 0,1 mg/ml, como contra-corante. Esta diluição foi a que melhor discriminou os soros positivos dos negativos, sem que ocorresse fluorescência inespecífica.

5. Técnica da reação

A técnica empregada foi a de imunofluorescência indireta. Antes das reações, as lâminas foram secadas por 5 min a 37°C. Gotas dos soros diluídos foram depositadas nas lâminas, que foram incubadas por 1 h, a 37°C, em câmara úmida, sendo a seguir, lavadas em 3 banhos de SST, de 10 minutos cada e novamente incubadas com o conjugado por 40 minutos, a 37°C, em câmara úmida; após lavagem em 3 banhos de SST, de 10 minutos cada, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada (pH 8).

6. Leitura das lâminas

Realizada em microscópio binocular de

fluorescência, RA Zeiss, provido de campo escuro, lâmpada HBO200W como fonte de luz ultravioleta e filtros BG12 (excitador) e 50 (barreira). *Reação positiva*: fungos com nítida fluorescência da parede celular, de intensidade variável para cada soro e progressivamente decrescente com as diluições de cada soro; corpo celular não fluorescente, corado em vermelho pelo azul de Evans (Fig. 1A).

Na leitura das lâminas realizadas com os eluatos, a intensidade de fluorescência foi classificada em: fraca (+), moderada (++) e intensa (+++). *Reação negativa*: fungos com parede e corpo celular não fluorescentes, corados em vermelho pelo azul de Evans. Em áreas onde os fungos estão aglomerados, observa-se a presença de grumos fluorescentes, inespecíficos (Fig. 1B), de aspecto bem diverso da fluorescência periférica, de membrana, vista nas reações positivas.

FRANCO, M. F. de; FAVA NETTO, C. & CHAMMA, L. C. — Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico da blastomicose sul-americana. Padronização da reação e comparação dos resultados com a reação de fixação do complemento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:393-398, 1973.

TABELA I

Títulos da reação de fixação do complemento (RFC) em 50 soros de pacientes com blastomicose sul-americana, distribuídos segundo os títulos que os mesmos soros apresentaram na reação de imunofluorescência indireta (RII)

RII		RFC	
Título	N.º de casos		
1/4	5	3—4—6—7—7,5	(média = 5,5)
1/8	4	6—7—8—28	(média = 12,2)
1/16	11	5—6—7—8—9,5—16—18—40—44—71—75	(média = 27,2)
1/32	11	2,6—3—13—14—15—19—21—46—48—53—85	(média = 21,3)
1/64	9	14—16—18—24—36—38—39—52—80	(média = 35,2)
1/128	7	18—30—33—43—128—135—220	(média = 86,7)
1/256	3	33—72—220	(média = 101,6)
Total	50		

Reações duvidosas ocasionais foram consideradas negativas.

RESULTADOS

Soros: Todos os soros dos pacientes portadores de BSA, positivos na RFC foram também positivos na RII. Os soros controles foram negativos em ambas as reações.

A correlação entre os títulos dos soros na RII e na RFC está explicada na Tabela I. Foi encontrada regressão linear significativa ($r = 0,95$; $p < 0,001$) entre as médias dos títulos da RFC (y) e os títulos da RII (x). A equação obtida foi: $y = 13,26 + 0,39x$.

Eluatos: Comparando a intensidade de fluorescência nas RII realizadas com os soros e com os eluatos correspondentes, observamos que ambas as reações foram positivas (+++) em 4 dos 9 soros; positivas (++) em outros 4 soros e em 1 caso a RII no soro foi positiva (+++) e no eluato positiva (++) .

DISCUSSÃO

Os métodos sorológicos de imunofluorescência são técnicas simples, envolvendo poucos reativos, sendo raros os fenômenos impeditivos de seu emprego; mais ainda possuem grande sensibilidade, podem ser realizados com pequenos volumes de soro ou mesmo a partir de gotas de sangue coletadas em papel de filtro.

A imunofluorescência indireta somente agora começa a ser empregada para o diagnóstico sorológico da BSA. Vimos já há algum tempo trabalhando na padronização de uma RII para a BSA². Recentemente, RESTREPO MORENO⁹ fez referência sumária a dados ainda não publicados sobre uma RII para o diagnóstico sorológico da BSA; obteve positividade de 96% e em 80% dos soros houve correspondência entre os títulos da RII e da RFC.

Na reação que padronizamos, encontramos positividade de 100% em 50 soros de pacientes com BSA, positivos na RFC. A correlação entre a média dos títulos na RFC e

os títulos correspondentes na RII foi altamente significativa ($p < 0,001$). A RFC e a RII foram realizadas com antígenos preparados de modo semelhante (FAVA NETTO³); desta forma, é provável que os antígenos tenham constituição química próxima, o que explicaria a semelhança dos resultados das duas reações.

A RII aplicada a eluatos de sangue coletados em papel de filtro mostrou resultados praticamente idênticos aos obtidos com os soros dos mesmos pacientes, fato este já referido por dois de nós (FRANCO & CHAMMA⁵). Esta reação se faz com mínima quantidade de sangue, coletada através de picada de polpa digital, abrindo excelente perspectiva para o seu emprego em trabalhos de campo.

A maior dificuldade técnica que encontramos na padronização da RII foi a fixação dos fungos nas lâminas; este problema foi em grande parte resolvido secando as lâminas por 5 minutos, a 37°C, antes da realização das reações. Recentemente, obtivemos melhores resultados com a técnica que vem sendo empregada por CAMARGO & HOSHINO (Comunicação pessoal) na RII para o sorodiagnóstico da doença de Chagas: na fase final do preparo do antígeno, os fungos foram tratados com formol a 3% e a seguir lavados em água destilada e ressuspensos em água destilada contendo soro normal de coelho a 1/200; esta suspensão foi então usada como antígeno e colocada sobre as lâminas.

Nossos resultados são preliminares, porém animadores. A RII parece se constituir num método sorológico útil no diagnóstico da BSA, especialmente quando surgem dificuldades no processamento técnico da RFC ou ainda em soros anti-complementares.

Atualmente, estamos realizando sistematicamente a RII e a RFC em soros de pacientes com BSA, de modo a prosseguir nossos estudos com casuística maior. Pretendemos também estudar a especificidade da RII, testando-a em soros de pacientes com outras micoses profundas.

S U M M A R Y

Indirect immunofluorescent antibody test for the serodiagnosis of South American blastomycosis. Description of the test and comparison of results with the complement fixation test

An indirect fluorescent antibody test (IFA) for the serological diagnosis of South American blastomycosis (SAB) was standardized. As antigen, we used the cellular walls of cerebriform forms of *Paracoccidioides brasiliensis* remaining in the sediment, after the preparation of the polysaccharide antigen for the Fava Netto's complement fixation test (CFT) for SAB. IFA was applied to 50 sera from patients with SAB, CFT positive, and to 50 sera from patients in which deep mycosis were excluded, CFT negative (control group). IFA was negative in the control group and positive in sera from patients with SAB. There was significant statistical correlation ($p < 0.001$) between titers of both tests. IFA was also tested with 9 eluates obtained from blood smears on filter paper from patients with SAB; sera from the same blood samples were simultaneously tested and both tests gave similar results.

The simplicity of the proposed method, its sensitivity and the fact that it may be done on eluates from blood smears on filter paper, make it applicable to large populational surveys.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:227-234, 1966.
2. CHAMMA, L. G. & FRANCO, M. F. — Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico da blastomicose sul-americana. Padronização da reação e comparação dos resultados com a reação de fixação do complemento. Em: *Anais da Jornada Científica da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu*, 1.º, Botucatu, 1971, p. 298.
3. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blasto-

FRANCO, M. F. de; FAVA NETTO, C. & CHAMMA, L. C. — Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico da blastomicose sul-americana. Padronização da reação e comparação dos resultados com a reação de fixação do complemento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:393-398, 1973.

- micose sul-americana, com antígeno polisacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exper.* 18:197-254, 1955.
4. FAVA NETTO, C. — Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (Blastomicose sul-americana). *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 21:99-194, 1961.
 5. FRANCO, M. F. & CHAMMA, L. G. — Technical modification of indirect immunofluorescent antibody test using filter paper blood eluates. (In press — *Int. Arch. Allergy*).
 6. KAPLAN, W. & CLIFFORD, M. K. — Production of fluorescent antibody reagents specific for the tissue form of *Coccidioides immitis*. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 89:651-658, 1964.
 7. KAPLAN, W. & IVENS, M. S. — Fluorescent antibody staining of *Sporotrichum schenckii* in cultures and clinical materials. *J. Invest. Derm.* 35:151-159, 1960.
 8. KEMP, G. & SOLOTOROVSKY, M. — Fluorescent antibody studies of pathogenesis in experimental *Candida albicans* infections of mice. *J. Immun.* 88:777-781, 1962.
 9. RESTREPO MORENO, A. — La inmunodifusión en gel de agar y la inmunofluorescencia en el diagnóstico de las micosis pulmonares. *Antioquia Med.* 22:337-345, 1972.
 10. REZAI, H. R. & HABERMAN, S. — The use of immunofluorescence for identification of yeastlike fungi in human infections. *Amer. J. Clin. Path.* 46:433-439, 1966.
 11. SILVA, M. E. & KAPLAN, W. — Specific fluorescein-labeled antiglobulins for the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 14:290-294, 1965.
 12. SILVA, M. E.; KAPLAN, W. & MIRANDA, J. L. — Antigenic relationship between *Paracoccidioides loboii* and other pathogenic fungi determined by immunofluorescence. *Mycopath. Mycol. Appl.* 36:97-106, 1968.
 13. SOUZA, S. L. & CAMARGO, M. E. — The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:255-258, 1966.

Recebido para publicação em 5/2/1973.